

Novel insights into the calcineurin/NFAT pathway in cardiac hypertrophy

Citation for published version (APA):

van Rooij, E. S. (2004). *Novel insights into the calcineurin/NFAT pathway in cardiac hypertrophy*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20041209er>

Document status and date:

Published: 01/01/2004

DOI:

[10.26481/dis.20041209er](https://doi.org/10.26481/dis.20041209er)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

SUMMARY

The heart consists of terminally differentiated cells, meaning that they have lost their ability to divide. When the heart becomes exposed to growth factors in response to increased workload, injury, or intrinsic defects in contractile performance, the cardiac muscle cells therefore start to grow, which is called cardiomyocyte hypertrophy. In 1998 Molkenkin et al. first identified the calcium-dependent phosphatase calcineurin as being a key mediator in this process of cardiomyocyte hypertrophy.

As soon as the role of calcineurin in cardiomyocyte hypertrophy became well established, pharmacological tools were applied to begin to determine whether inhibition of calcineurin activity *in vivo* might be an effective means of preventing cardiac hypertrophy. In chapter 1 we review the use of the pharmacological calcineurin inhibitors CsA and FK-506 to prevent hypertrophy in response to a variety of pathological stimuli, and discuss the opportunities to use genetically modified animals.

In chapter 2 we investigate calcineurin's involvement in left ventricular hypertrophy as a consequence of acute myocardial infarction. We were able to identify calcineurin as a key player in the maladaptive remodeling process of the remote myocardium following myocardial infarction, characterized by fibrosis and chamber dilation, resulting in overt heart failure. The use of a genetic mouse model with a mild myocyte-restricted overexpression of Modulatory Calcineurin Interacting Protein 1 (MCIP1) to effectively block calcineurin activity specifically in the heart, enabled us to indicate that inhibition of calcineurin activity is able to largely prevent these pathological characteristics.

Taken the apparent importance of calcineurin signaling in maladaptive hypertrophy, in chapter 3 we attempted to further elucidate the downstream substrate of calcineurin, the transcription factor nuclear factor of activated T-cells (NFAT). Our data indicate both the presence and transcriptional activity of all four, calcineurin-sensitive members of the NFAT family (NFATc1, c2, c3 and c4) in the ventricular cardiomyocyte cell lineage. A dominant negative approach enabled us to simultaneously abrogate NFAT-dependent transcriptional activity and rendered cardiomyocytes resistant to calcineurin- and agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy, indicating the requirement of NFAT in cardiomyocyte hypertrophy.

Despite the wealth of information linking calcineurin and the progression of cardiac hypertrophy, little is known of the exact mechanism by which calcineurin promotes growth of the cardiac myocyte. In chapter 4 we were able to both *in vitro* and *in vivo* indicate the existence of a transcriptional regulatory complex in cardiomyocytes involving proteins of the NFAT and MEF2 families of transcription factors. This interaction integrates the Ca^{2+} -activated CnA/NFAT signaling pathway with the myogenic transcriptional activity of MEF2, that is

required for cardiomyocytes to fully undergo Ca^{2+} /CnA-induced hypertrophy.

In chapter 5 we investigated cardiac remodeling after MI in mice lacking the histone deacetylase, HDAC9. Since the transcriptional activity of MEF2 is repressed by histone deacetylases, and due to the interaction between NFAT and MEF2, we hypothesized that HDAC9-null animals would be hypersensitive to myocardial infarction induced calcineurin activation and would therefore ultrarapid develop cardiac hypertrophy and failure. However, although MI resulted in an severe deterioration in contractile function and increased mortality for the male HDAC9 knockout animals, surprisingly, compared to wild type animals, the female HDAC9 knockout animals showed less remodeling, which resulted in a better maintained cardiac contractility and structure. More detailed examination showed this effect to be attributable to an enhanced angiogenic response in the infarcted area of the HDAC9 knockout females.

In chapter 6 the major findings of this thesis and future directions for research on calcineurin signaling are discussed. Our data emphasize the significance of the calcineurin/NFAT pathway in cardiomyocyte hypertrophy, reveal its maladaptive character and unravel the downstream effectors, and might possibly attribute to future therapeutic drug design for the treatment of hypertrophic heart disease.

SAMENVATTING

Het hart bestaat uit terminaal gedifferentieerde cellen, wat betekent dat zij het vermogen om te delen zijn verloren. Zodra het hart, als gevolg van een toename in werklast of intrinsieke defecten in contractiliteit, wordt blootgesteld aan groeifactoren, beginnen de hartspiercellen te groeien, wat cardiomyocythypertrofie wordt genoemd. In 1998 ontdekte Molkenkin *et al.* dat de calciumafhankelijke fosfatase calcineurine een belangrijke rol speelt in dit proces van cardiomyocythypertrofie.

Zodra de rol van calcineurine in cardiomyocythypertrofie een geaccepteerd gegeven werd, begon men farmacologische substraten te gebruiken om te bepalen of inhibitie van calcineurine activiteit *in vivo* een effectieve manier is om cardiale hypertrofie te voorkomen. In hoofdstuk 1 bediscussiëren we het gebruik van farmacologische inhibitie van calcineurine met behulp van CsA en FK-506 om hypertrofie als gevolg van een verscheidenheid aan pathologische stimuli te voorkomen en zetten we de mogelijkheden om genetisch gemodificeerde dieren te gebruiken uiteen.

In hoofdstuk 2 onderzoeken we de betrokkenheid van calcineurine in hypertrofie van het linker ventrikel als gevolg van een acuut myocard infarct. Wij zijn in staat gebleken calcineurine aan te wijzen als een belangrijke factor in het proces van maladaptieve remodellering van het niet-geïnfarceerde deel van het hart na een hartinfarct, wat wordt gekarakteriseerd door fibrose, dilatatie en uiteindelijk hartfalen. Het gebruik van een genetisch gemodificeerde muis die Modulatory Calcineurin Interacting Protein 1 (MCIP1) in hartspiercellen tot overexpressie brengt om calcineurine activiteit specifiek in deze cellen te blokkeren, heeft ons in staat gesteld aan te tonen dat inhibitie van calcineurine activiteit deze maladaptieve verschijnselen grotendeels voorkomt.

Doordat calcineurine klaarblijkelijk een belangrijke rol speelt in pathologische hypertrofie, hebben we in hoofdstuk 3 getracht de onderliggende effector van calcineurine, de transcriptie factor 'nuclear factor of activated T-cells (NFAT)', verder uit te diepen. Onze data tonen aan dat alle vier calcineurine gevoelige leden van de NFAT familie van transcriptiefactoren (NFATc1, c2, c3 en c4) aanwezig zijn in ventriculaire hartspiercellen en tevens transcriptioneel actief zijn. Een dominant negatieve aanpak, waarmee we simultaan alle NFAT-afhankelijke transcriptionele activiteit kunnen blokkeren, resulteerde in cardiomyocyten die niet langer een hypertrofe respons vertoonden in reactie op calcineurine of andere hypertrofe agonisten, wat aangeeft dat NFAT vereist is in cardiomyocythypertrofie.

Ondanks de veelheid aan informatie over calcineurine en de ontwikkeling van cardiale hypertrofie, is er nog maar weinig bekend over het mechanisme waarmee calcineurine groei van hartspiercellen bewerkstelligt. In hoofdstuk 4

tonen wij zowel *in vitro* als *in vivo* het bestaan van een transcriptioneel regulerend complex in hartspiercellen tussen NFAT eiwitten en MEF2 factoren aan. Deze interactie integreert de Ca^{2+} -geactiveerde CnA/NFAT signaleringsroute en de myogene transcriptionele activiteit van MEF2, welke in hartspiercellen vereist is om een volledige Ca^{2+} /CnA geïnduceerde hypertrofe respons te vertonen.

In hoofdstuk 5 hebben we de cardiale remodellering na een myocard infarct onderzocht in muizen die de histon deacetylase 9 missen (HDAC9 knockout). Omdat de transcriptionele activiteit van MEF2 wordt onderdrukt door histon deacetylases en door de interactie tussen NFAT en MEF2, was onze hypothese dat deze HDAC9 knockout muizen hypersensitief zouden zijn voor activatie van calcineurine als gevolg van het myocard infarct en daardoor extra snel hypertrophy zouden ontwikkelen en in falen gaan. Hoewel het infarct in de mannelijke HDAC9 knockout muizen resulteerde in een verslechtering van cardiale contractiliteit en een verhoogde mortaliteit ten opzichte van wild type muizen, vertoonden de vrouwelijke HDAC9 knockout muizen verrassend genoeg een verminderde remodellering, wat resulteerde in behoud van contractiliteit en structuur. Meer gedetailleerd onderzoek toonde aan dat dit effect toe te schrijven is aan een verbeterde angiogene respons in het infarct gebied van de vrouwelijke HDAC9 knockout muizen.

In hoofdstuk 6 bediscussiëren we de belangrijkste bevindingen van dit proefschrift en de toekomstige richting voor het calcineurine onderzoek. Onze data benadrukken de significante bijdrage van de calcineurine/NFAT route in hypertrofie van de hartspiercel, onthullen het maladaptieve karakter en ontrafelen de onderliggende effectors en kunnen mogelijk een bijdrage leveren aan de ontwikkeling van toekomstige therapeutische drugs voor de behandeling van hypertrofe hartziekten.